

УДК 619:616.98:578:636.4

Красочко П.П., доктор биологических наук, доцент<sup>1</sup>  
Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>2</sup>  
Кайсюань Би, аспирант<sup>1</sup>

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск, Республика Беларусь

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

### Резюме

В репродуктивной патологии свиней особую роль играет вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС). Для быстрого, высокочувствительного и специфичного обнаружения вирусного генома широкое распространение получили молекулярно-биологические методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные разработки направлены на создание диагностических тест-систем, которые позволяют с высокой эффективностью выявлять геном возбудителя в образце, что значительно сокращает время и стоимость тестирования. Разработанный метод позволяет выявлять геном вируса РРСС в разном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с высокой чувствительностью.

Изучение вышеуказанной инфекции показало ее широкое распространение в патологии свиней. Так, серопозитивность свиней к вирусу РРСС на отдельных свинокомплексах составляет 77,5 %.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, распространение, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней, позитивность.

### Summary

In the reproductive pathology of pigs, the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (RRSS) plays a special role. For the rapid, highly sensitive and specific detection of the viral genome, molecular biological methods, primarily polymerase chain reaction (PCR), have become widespread. Modern developments are aimed at creating diagnostic test systems that allow high efficiency to identify the pathogen genome in the sample, which significantly reduces the time and cost of testing. The developed method makes it possible to identify the RRSS virus genome in various biological material (blood serum, parenchymal organs, virus isolates) with high sensitivity.

The study of the above infection showed its widespread distribution in the pathology of pigs. Thus, the seropositivity of pigs to the PRRS virus on individual pig farms is 77,5 %.

**Keywords:** polymerase chain reaction, spread, porcine reproductive-respiratory syndrome virus, positivity.

Поступила в редакцию 14.10.2025 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В репродуктивной патологии свиней наибольшую роль играют вирусы репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), цирковир 2 типа (ЦВС-2), вирус гриппа свиней, парвовирус (ПВС) и в меньшей степени – вирус классической чумы свиней (КЧС) и вирус болезни Ауески из-за обязательной вакцинации и благополучия свинокомплексов по данным болезням в Республике Беларусь. Особую роль в репродуктивной патологии свиней играет вирус РРСС.

Для эффективного мониторинга, контроля и проведения дифференциальной диагностики разработано множество лабораторных методов. Традиционные методы,

такие как вирусная изоляция и серологические анализы, включая иммуноферментный анализ, позволяют выявлять вирус или антитела к нему. Однако для быстрого, высокочувствительного и специфичного обнаружения вирусного генома, особенно в условиях коинфекций и генетической гетерогенности, широкое распространение получили молекулярно-биологические методы, в первую очередь полимеразная цепная реакция (ПЦР). Современные разработки направлены на создание диагностических систем, которые позволяют с высокой эффективностью выявлять возбудителей методом ПЦР, что значительно сокращает время и стоимость тестирования [6].

**Целью** настоящей работы явилась разработка метода выявления нуклеиновых кислот вируса РРСС методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных, на кафедре эпизоотологии и инфекционных болезней УО ВГАВМ, лаборатории молеку-

лярной биологии Института ветеринарной медицины Внутреннего Монгольского аграрного университета (Китайская Народная Республика).

Для оценки распространённости РРСС использовали результаты диагностических исследований, выполненных в УО ВГАВМ в период 2018–2022 гг., для выявления генома вируса РРСС – олигонуклеотиды, предложенные Всемирной организацией здоровья животных (таблица 1).

Таблица 1 – Последовательности олигонуклеотидов для выявления геном вируса РРСС

Наименование вируса	Шифр олигонуклеотида	Последовательность
РРСС	EU-1 F	5'-GCA-CCA-CCT-CAC-CCR-RAC-3'
	EU-2 F	5'-CAG-ATG-CAG-AYT-GTG-TTG-CCT-3'
	EU-1 R	5'-CAG-TTC-CTG-CRC-CYT-GAT-3'
	EU-2 R	5'-TGG-AGD-CCT-GCA-GCA-CTT-TC-3'
	Probe EU-1	5'-(6-HEX)-CCT-CTG-YYT-GCA-ATC-GAT-CCA-GAC-(BHQ1)
	Probe EU-2	5'-(HEX)-ATA-CAT-TCT-GGC-CCC-TGC-CCA-YCA-CGT-BHQ1

В качестве положительного контроля использовали штамм вируса РРСС «КМИЭВ-V112» (РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского»).

Для оценки специфичности метода в качестве положительных образцов использовали РНК, выделенную из патологического материала (кровь, сыворотка, кусочки паренхиматозных органов от свиней и поросят), с подтверждённым наличием нуклеиновых кислот вируса РРСС с помощью коммерческих тест-систем, а также гетерологичные штаммы вирусов и бактерий, потенциально инфицирующие свиней: вирус КЧС (КМИЭВ-V113), вирус болезни Ауески (штамм «ГНКИ»), *Escherichia coli* (штамм ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC BAA-2162), *Streptococcus suis* (изолят УО ВГАВМ), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619).

Для выделения РНК использовали коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот «Рибо-Преп», «Рибо-Сорб» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), «АртДНК» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Для выявления генома вируса РРСС использовали коммерческие наборы «АртТест

РРСС» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь) и «Тест-система «РРСС» для выявления и генотипирования вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), «Набор реагентов «ПЦР-РРСС-ФАКТОР» (ООО «ВЕТ ФАКТОР», Россия).

ПЦР ставили в режиме реального времени с использованием амплификатора «Rotor Gene 3000». Учёт реакции проводили в соответствии с инструкциями к диагностическим наборам.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенные нами ранее исследования по распространённости РРСС в Республике Беларусь показали актуальность разработки средств быстрой и эффективной диагностики [1, 4].

Анализ проведенных в отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней УО ВГАВМ (ранее – лаборатория биотехнологии научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО ВГАВМ) серологических исследований показал высокий процент положитель-

ных проб сывороток крови: из 267 образцов, исследованных в период 2020–2022 гг., 207 были положительными на наличие специфических антител к вирусу РРСС, что составляет 77,5 %. Исследования по выявлению генома вируса не были столь обширны, но при выявлении положительной пробы 90–100 % проб из этой же группы содержали геном РРСС.

Высокий уровень серопозитивности является следствием вакцинации против данного возбудителя, т.к. в настоящее время в Республике Беларусь лишь единичные свинокомплексы, как правило, племенные или специализирующиеся на откорме, не проводят вакцинацию. Несмотря на проводимые профилактические мероприятия, РРСС остается актуальной проблемой свиноводства ввиду высокой вариабельности вируса. Вакцины не обеспечивают стерильного иммунитета, и животные на фоне вакцинации остаются носителями вируса, что создает угрозу заражения неиммунизированного поголовья и, как следствие,

приводит к выявлению положительных проб методом ПЦР в вакцинированном стаде.

Для разработки метода выявления генома вируса РРСС первоначально были протестированы олигонуклеотиды к вирусу РРСС в реакции ПЦР с предложенными в методике условиями:

- состав реакционной смеси: праймеры – по 10,0 пмоль, олигонуклеотидные зонды – по 5,0 пмоль, ArtMix ревертаза (5×) – 5,0 мкл, деионизированная вода – до 15,0 мкл; выделенная РНК – 10,0 мкл;

- условия ПЦР: обратная транскрипция – 55 °С 10 мин; денатурация – 95 °С 2 мин; 45 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С 5 с, отжига при 60 °С 15 с, элонгации при 67 °С 15 с; учет флуоресценции после стадии отжига.

В качестве испытуемых образцов выступали штамм вируса РРСС «КМИЭВ-V112» и положительные образцы клинического материала с подтвержденным содержанием РНК вируса (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты выявления генома вируса РРСС

Наименование испытуемого материала	Количество проб	Результат
Штамм «КМИЭВ-V112»	1	положительный
Положительные сыворотки крови	8	положительный (8 проб)
Отрицательные сыворотки крови	20	отрицательный (20 проб)
Положительный патологический материал	9	положительный (9 проб)
Отрицательный патологический материал	19	отрицательный (19 проб)

Как видно из таблицы, используемые олигонуклеотиды достоверно позволяют выявить РНК вируса РРСС в сыворотках крови и патологическом материале, инфицированном циркулирующими в свиноводческих хозяйствах штаммами вируса РРСС.

Далее отработанный метод выявления генома вируса РРСС протестирован со следующими условиями:

- состав реакционной смеси: праймеры к вирусу РРСС – 5,0 пмоль, ArtMix ревертаза (5×) – 5,0 мкл, деионизированная вода – до 15,0 мкл; выделенные нуклеиновые кислоты 10,0 мкл;

- условия ПЦР: обратная транскрипция – 55 °С 10 мин; денатурация 95 °С 2 мин; 45 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С 5 с, отжига при 60 °С 15 с, элонгации при 67 °С 15 с; учет флуоресценции после стадии отжига (канал HEX соответствует вирусу РРСС).

Для оценки относительной чувствительности метода были подготовлены смеси нуклеиновых кислот, содержащих РНК выявляемого вируса в различных вариантах, и РНК из патологического материала, проведены ПЦР в сравнении с коммерческим набором. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Значения пороговых циклов при тестировании метода выявления генома вируса РРСС

Наличие генома вирусов в составе смеси нуклеиновых кислот	Значение порогового цикла	
	разработанный метод	коммерческий набор («АртТест РРСС»)
ПВС	–	–
ЦВС-2	–	–
РРСС	23,4	22,9
ПВС + ЦВС-2	–	–
ПВС + РРСС	25,1	25,9
ЦВС-2 + РРСС	25,8	24,9
ПВС + ЦВС-2 + РРСС	26,7	27,2
Пат. материал 1	36,8	35,7
Пат. материал 2	32,4	33,1
Пат. материал 3	16,5	16,1

Как видно из таблицы 3, чувствительность метода выявления вируса РРСС соответствует коммерческому набору – значения порогового цикла варьируются в пределах одного цикла, из чего можно заключить, что чувствительность метода со-

ставляет  $10^3$  ГЭ/мл (чувствительность коммерческого набора).

Для определения аналитической специфичности метода были поставлены ПЦР с различным биологическим материалом с использованием разработанного метода (таблица 4).

Таблица 4 – Выявление генома вируса РРСС разработанным методом

Наименование образца	Количество образцов	Количество положительных образцов, выявленных разработанным методом	Количество положительных образцов, выявленных коммерческими тест-системами
Пат. материал (сыворотка крови, паренхиматозные органы)	152	17	17
Штамм ПВС	1	0	0
ЦВС-2	2	0	0
Штамм РРСС	1	1	1
Вирус КЧС	1	0	0
Вирус болезни Ауески	1	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0
<i>Salmonella enterica</i>	1	0	0
<i>Streptococcus suis</i>	1	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	0



Полученные результаты показали, что разработанный метод обнаружения генома вируса РРСС обладает высокой специфичностью и позволяет идентифицировать вирус как в чистом виде (штаммы или изоляты), так и в патологическом материале. По своей специфичности метод не уступает коммерческим тест-системам.

### ВЫВОДЫ

Проведенные серологические исследования сывороток крови свиней в 2020–2022 гг. показали высокий уровень серопо-

зитивности стада к вирусу РРСС – 77,5 %, что обусловлено как циркуляцией вируса, так и проводимой вакцинацией. Для эффективной диагностики репродуктивно-респираторного синдрома свиней нами разработан ПЦР-метод, который позволяет выявлять геном вышеуказанного вируса в различном биологическом материале (сыворотка крови, паренхиматозные органы, изоляты вируса) с чувствительностью, не уступающей коммерческим диагностическим тест-системам ( $10^3$  ГЭ/мл).

### СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Болезни вирусной этиологии репродуктивных органов свиноматок / П. А. Красочко, П. П. Красочко, Б. Кайсюань [и др.] // Наше сельское хозяйство. – 2021. – № 14 (262). – С. 52–56. – EDN JGGYPI.
2. Мальцева, Б. М. Смешанное течение репродуктивно-респираторного синдрома и парвовирусной инфекции свиней / Б. М. Мальцева // Ветеринария. Реферативный журнал. – 2001. – № 1. – С. 230.
3. Максимович, В. В. Инфекционные болезни свиней: монография – 2 изд., перераб. и доп. – Витебск : УО ВГАВМ, 2011. – 340 с. – EDN VYTLKJ.
4. WOAH Terrestrial Manual 2021: 3.9.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome (infection with PRRS virus) - online version.
5. Co-infection dynamics of porcine parvovirus and PRRSV in European swine herds / I. Mészáros [et al.] // Veterinary Microbiology, 2019. – 231. – P. 87–94.
6. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Chapter 3.9.6. Porcine reproductive and respiratory syndrome (infection with PRRS virus). – 2020. Online version.
7. A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure / R. Palinski, P. Piñeyro, P. Shang [et al.] // Journal of Virology. – 2016. – Vol. 91. – Is. 1. e01879-16. DOI 10.1128/JVI.01879-16.

## ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ С АДГЕЗИВНЫМИ АНТИГЕНАМИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА ПОРОСЯТ



**ДЛЯ ИММУНИЗАЦИИ  
ГЛУБОКО СУПОРОСНЫХ  
СВИНОМАТОК И,  
ПРИ ПОКАЗАНИЯХ,  
ПОРОСЯТ-СОСУНОВ  
С 20–30-ДНЕВНОГО  
ВОЗРАСТА**

**Штаммы бактерий  
ESCHERICHIA COLI  
с адгезивными антигенами  
F41, K88 (F4), K99 (F5),  
987 P (F6), LT-токсоид**

**Защитный титр  
колостральных  
антител сохраняется  
у новорожденных  
поросят до 30-дневного  
возраста**



**WWW.BIEVM.BY**